Rev. Chilena Ent.
2000, *27*: 11 - 17

PARÁMETROS POBLACIONALES DE DOS ESPECIES DE *NEOTOXOPTERA* THEOBALD (HOMOPTERA: APHIDOIDEA) SOBRE AJO (*ALLIUM SATIVUM* L.) EN CONDICIONES DE LABORATORIO.

Araceli Vasicek [1], Francisco La Rossa [2] y Alejandro Moreno [1]

RESUMEN

En el presente trabajo se obtuvieron y compararon los principales parámetros biológicos y poblacionales de *Neotoxoptera oliveri* y *N. formosana* sobre ajo, en condiciones de laboratorio. Dos cohortes de cada una de las especies fueron criadas a 20± 1 °C, 70% de humedad relativa y 14:10 horas (fotofase: escotofase). La duración de los períodos pre y post reproductivo no mostraron diferencias significativas. *N. formosana* presentó un período reproductivo casi 1.5 veces más largo que el de *N. oliveri*, y la longevidad fue levemente superior. Se observaron diferencias significativas en la tasa intrínseca de incremento natural (r_m) cuyos valores máximos fueron 0.234 y 0.295 para *N. oliveri* y *N. formosana*, respectivamente. La tasa reproductiva neta (R_0) calculada para las cohortes de *N. formosana* resultaron casi el doble de los valores hallados para *N. oliveri*. Las curvas de sobrevivencia (l_x) mostraron tendencias similares en ambas especies aunque *N. oliveri* comienza a declinar unos 5-7 días antes. Los valores máximos de la curva de fecundidad por edades (m_x) superan las 5 ninfas/día en *N. formosana*, mientras que los de *N. oliveri* no alcanzan las 3 ninfas/día. Estos resultados indican que *N. formosana* podría ser un problema mayor que *N. oliveri* en cultivos de ajo.
Palabras clave: *Neotoxoptera oliveri*, *Neotoxoptera formosana*, ajo, tablas de vida, parámetros poblacionales, tasa intrínseca de incremento natural.

ABSTRACT

Populational parameters of *Neotoxoptera oliveri* y *N. formosana* on garlic under laboratory conditions were obtained and compared. Two cohorts of each species were reared at 20± 1 °C, 70% relative humidity and 14:10 hours L: D cycle. Lenghts of pre and post-reproductive periods showed no significative differences but reproductive period of *N. formosana* was almost 1.5-times greater than *N. oliveri, and* longevity was sligthly larger in the former species. Significative differences were observed among the intrinsic rate of natural increase (r_m) whose maximum values were 0.234 and 0.295 for *N. oliveri* and *N. formosana* respectively. The reproductive net rate (R_0) of *N. formosana* were almost two times greater than the other species. Survivorship curves (l_x) have similar trend in both species but *N. oliveri* begin to decline 5-7 days early. Maximum values of age-fecundity (m_x) of *N. formosana* overcomes 5 nimphs/day while those of *N. oliveri* did not reach 3 nimphs/day. This results indicate that *N. formosana* could be a greater problem than *N. oliveri* on garlic crops.
Key words: *Neotoxoptera oliveri*, *Neotoxoptera formosana*, garlic, life tables, populational parameters, intrinsic rate of natural increase.

INTRODUCCION

En Argentina se han detectado recientemente dos especies de áfidos en cultivos de Alliaceae cuya densidad y daños resultaron llamativos. Ambas especies fueron identificadas como *Neotoxoptera oliveri* (Essig, 1935) y *Neotoxoptera formosana* (Takahashi, 1921). La primera de ellas posiblemente ya se hallaba presente desde hace tiempo y ha sido confundida con *N. violae* (Pergande, 1900) como ocurrió en otros países (Nieto Nafría *et al.*, 1994). La segunda especie mencionada parecería ser de reciente introducción en el Cono Sur, pues ha sido verificada su presencia en Brasil (Souza-Silva e

[1] Cátedra de Zoología Agrícola. Departamento de Sanidad Vegetal. Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales. 60 y 119- CC 31 (1900) La Plata. UNLP. Buenos Aires. Argentina.
[2] Instituto de Microbiología y Zoología Agrícola. Centro de Investigaciones de Ciencias Veterinarias y Agronómicas. INTA. CC 25 (1712). Castelar. Buenos Aires. Argentina.
(Recibido: 29/04/99. Aceptado: 03/07/00)

Ilharco, 1995) y en Chile (Starý *et al.*, 1994). Por otra parte, hasta 1985 no se lo menciona para América del Sur (Blackman & Eastop, 1985).

En el resto del mundo *N. formosana* se encuentra difundido en China, Taiwan, Corea, Australia, Nueva Zelanda, Hawaii y América del Norte. Por su parte, *N. oliveri* se encuentra en Portugal, Africa y en Brasil. El rango de hospederos de *N. formosana* parece estar restringido a Alliaceae, mientras que *N. oliveri* se encuentra en especies de otras familias tales como Violaceae y Caryophyllaceae.

N. formosana, además de formar colonias con gran número de individuos sobre hojas de diferentes especies de *Allium,* también es capaz de atacar bulbos en almacenamiento (Lange,1944; Blackman & Eastop, 1985). No se han hallado antecedentes acerca de la tranmisión de virus por parte de ambas especies (Blackman & Eastop, 1985).

A pesar de ser ambas especies conocidas en varios países, no se han encontrado antecedentes sobre su biología y comportamiento. Esto es preocupante, considerando que *N. formosana* podría ser una plaga potencial para nuestros cultivos de ajo y no sería posible adaptar o implementar alguna estrategia de control.

El cultivo de ajo reviste gran importancia económica en Argentina debido a que, de las 90.300 tn producidas, 62.387 tn se exportan para consumo en fresco o bajo distintas formas de industrialización (Anónimo, 1998). La presencia de estas dos especies podrían ocasionar graves pérdidas, principalmente durante el inicio del cultivo; ya que en infestaciones foliares leves provocan clorosis y marchitamiento concluyendo con la muerte de las plantas. Esto obligaría a la resiembra, complicando el manejo en cultivos comerciales.

Los parámetros poblacionales suelen ser de gran utilidad para tipificar y caracterizar una población animal (Rabinovich, 1980) y es particularmente interesante el cálculo de estimadores estandarizados de la tasa de incremento en poblaciones de insectos (Southwood, 1994). Se ha demostrado que dichos estimadores son medidas de carácter predictivo y comparativo de la potencialidad de crecimiento en poblaciones de insectos plaga o benéficos (Hulting *et al.*, 1990). El conocimiento de dichos parámetros permiten planificar, elaborar y ajustar estrategias de control en el marco del Manejo Integrado de Plagas (MIP).

El objetivo del presente trabajo es aportar nueva información para el mejor conocimiento de los aspectos poblacionales de *N. formosana* y *N. oliveri.*

MATERIALES Y METODOS

Los ensayos se llevaron a cabo en el insectario de la Cátedra de Zoología Agrícola, FCA y F La Plata. Con recolectado en establecimientos hortícolas de la zona, se aumentó la población mediante la cría sobre el hospedador, obteniéndose así, los progenitores originales -colonias madres- a partir de los cuales se iniciaron los ensayos. Se dispusieron individualmente hembras adultas sobre ajo en brotación. Luego de 24 horas se retiraron las crías y las adultas, dejando sobre cada planta un individuo recién nacido, con el fin de que cada integrante de la cohorte presentase aproximadamente la misma edad inicial. De esta manera se conformaron dos cohortes de cada especie, compuestas por 20 ninfas iniciales cada una, totalizando 80 individuos.

Para la crianza individual de los áfidos se acondicionaron recipientes de plástico de 60 cm^3 conteniendo tierra, cerrados con una tapa perforada que permitía la emergencia del brote, y otro orificio por el cual se inyectaba agua semanalmente para garantizar los requerimientos hídricos de la planta. El material en estudio se protegió con envases transparentes de idénticas características, cubriéndose la parte superior con una malla de tul que permitiera la aireación. El material vegetal se renovó según las necesidades. Esta experiencia se condujo en una cámara climatizada a 20 ± 1°C, 70% de HR y fotofase de 14 horas.

Los áfidos fueron observados diariamente, registrándose los cambios de estadío, los individuos muertos y, una vez alcanzado el estado reproductivo, los nacimientos. Los parámetros obtenidos fueron: a) período ninfal, definido como el tiempo que transcurre desde el nacimiento hasta la cuarta muda; b) período pre-reproductivo, desde la cuarta muda hasta el primer nacimiento; c) período reproductivo, considerado como el tiempo que transcurre desde la puesta de la primera hasta la última ninfa y d) período post-reproductivo, desde este momento hasta la muerte del áfido. Además, se evaluó longevidad, considerada como la duración total de vida y la fecundidad considerada como la descendencia promedio de los individuos (hembras)

que alcanzaron el estado adulto en cada una de las cohortes. Estos valorès fueron comparados mediante ANDEVA y test de Tukey con a=0.05. Se usó el ANDEVA para analizar la duración de los periodos ninfal, pre-reproductivo, reproductivo, post-reproductivo y la fecundidad, considerando cada individuo como una réplica dentro de cada cohorte y especie. Con el test de Tukey se compararon las medias tanto intra como interespecificamente.

A partir de la confección de tablas de vida se estimaron los estadísticos vitales: supervivencia por edades (l_x); fecundidad (m_x) y los siguientes parámetros poblacionales: tasa reproductiva neta (R_0); tasa intrínseca de crecimiento natural (r_m); capacidad de incremento de la cohorte (r_c), tiempo generacional (T); tiempo generacional de la cohorte (T_c); tasa finita de crecimiento (l) y tiempo de duplicación (D), siendo:

l_x = % de sobrevivientes a la edad x/100 (expresado sobre la base de 1000 individuos)

m_x = número medio de ninfas /hembra aún viva a la edad x

$$R_0 = \sum_{x=0}^{\infty} l_x m_x$$

El parámetro r_m se calculó mediante la iteración de la ecuación de Lotka:

$$\sum_{x=0}^{\infty} l_x m_x e^{-rm\,x} = 1$$

$$r_c = \ln R_0 / T_c$$

$$T = \ln R_0 / r_m$$

$$T_c = \sum x\, l_x m_x / \sum l_x m_x$$

$$\lambda = e^{m}$$

$$D = \ln 2 / r_m$$

La R_0 representa el número promedio de hembras recién nacidas por hembra. Es una primera medida de la capacidad reproductiva; r_m es el número de hembras por hembra en una unidad de tiempo y expresa la capacidad intrínseca de la población para reproducirse sin influencia de factores externos de mortalidad, en un lapso determinado, en este caso la unidad empleada fue el día; r_c es equivalente a r_m con las mismas unidades pero de una cohorte, su valor constituye una aproximación y se utiliza normalmente como "semilla" para comenzar el proceso iterativo tendiente a despejar la r_m de la ecuación de Lotka. (Rabinovich, 1980); T también denominado tiempo generacional medio o corregido, se refiere al tiempo que transcurre para que se desarrolle una generación completa dentro de una población; T_c se refiere a una cohorte y puede interpretarse como la edad promedio de las hembras al nacimiento de sus hijas (Bengston, 1969) y estos dos últimos parámetros pueden considerarse como una tasa de recambio, nótese que de este valor depende también la r_c ya comentado; l es el número de veces que una población se multiplica sobre sí misma por unidad de tiempo y con ella es posible calcular el número potencial de individuos hembra al cabo de un tiempo determinado partiendo de 1 o varias hembras y D es el tiempo requerido por una población para duplicarse en número.

Para la comparación de las r_m correspondientes a las dos especies de áfidos se obtuvieron las «r_m» estimadas junto con su error estándar (E.E.) para cada cohorte mediante el método de Acuchillamiento de datos («Jackknife») (Tukey, 1958), que básicamente consiste en calcular parámetros de muestras formadas por (n) arreglos distintos de (n-1) elementos muestrales; en este caso (n) es el número de individuos iniciales de cada cohorte. Esta herramienta fue utilizada por Hulting *et al.* (1990) para obtener un estimador de la r_m y otros parámetros, su error estándar y consecuentemente un intervalo de confianza para la misma, permitiendo así la comparación entre cohortes. Los estadísticos fueron comparados mediante las fórmulas utilizadas en Hulting *et al.* (1990):

$$(\hat{r}jack^{(1)} - \hat{r}jack^{(2)}) \pm t_{f\frac{\alpha}{2}} \sqrt{\frac{(\hat{\sigma}^{(1)})^2}{} + \frac{(\hat{\sigma}^{(2)})^2}{}}$$

y

$$f = \frac{n_1 + n_2}{2} - 1$$

donde:

$\hat{r}jack^{(1)}$ y $\hat{r}jack^{(2)}$: valores de r_m estimados mediante Acuchillamiento de datos para cada cohorte

t : valor de la distribución t de Student
f : grados de libertad
n : número de individuos iniciales
$\hat{\sigma}^{(1)}$ y $\hat{\sigma}^{(2)}$: errores estandard de los estimadores r_{jack}

Si ambos valores obtenidos no incluyen el 0, las r_m de las cohortes se consideran diferentes.

RESULTADOS Y DISCUSION

Tal como se observa la duración de los distintos estados de desarrollo no difirió significativamente (Tabla 1) en los períodos pre y post-reproductivo de ambas especies. La duración de el período ninfal es variable. El período reproductivo, de *N. formosana* (22.4-24.6 días) presenta una duración casi 1.5 veces más larga respecto de *N. oliveri* (16.5-17.8 días). La fecundidad más alta unida a un período reproductivo más largo evidencian el mayor potencial biológico de *N. formosana.* En cuanto a la longevidad ocurre algo similar a lo acontecido en el período ninfal en cuanto a la variabilidad, si bien en *N. formosana* fue levemente superior.

En general se observa en *N. formosana* una mayor proporción de individuos que alcanza antes el estado adulto respecto de *N. oliveri*, como lo indica la estabilización del nivel máximo de la curva de dicho estado. Se evidencia una mayor sobre posición de los distintos estadios ninfales en *N. formosana* respecto de la otra especie (e.g en día 5 se pueden observar representantes de las cuatro edades para *N. formosana,* mientras que solo hay 3 estadios representados en *N. oliveri*). Por otra parte la amplitud de las curvas correspondientes al tercer y cuarto estadios (n3 y n4) indica un retardo para alcanzar el estado adulto en *N. oliveri* (Fig. 1). Concomitantemente, la mortalidad en los adultos de *N. formosana* comienza a manifestarse alrededor del día 25, mientras que en *N. oliveri* esto ocurre unos cinco días antes, con una caída de la curva más gradual (Fig. 1).

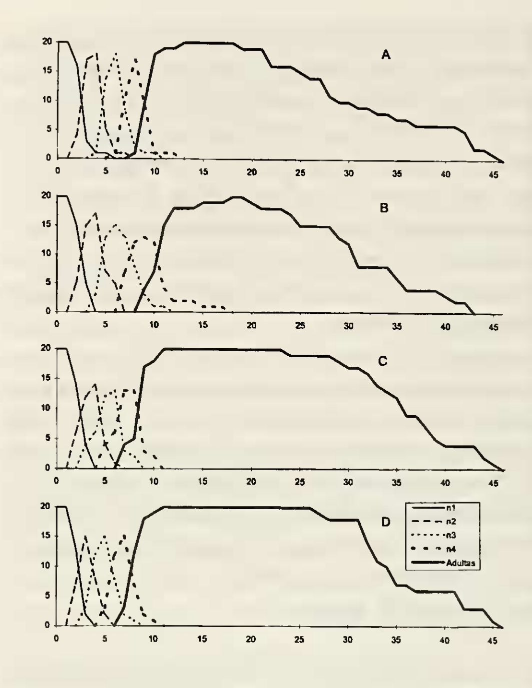


Figura 1. Número de individuos y duración en días de los estadios ninfales y del estado adulto en dos especies de *Neotoxoptera* sobre ajo. A y B: *N. oliveri*; C y D: *N. formosana.*

Los principales estadísticos vitales (R_0 y r_m) fueron significativamente mayores en *N. formosana* que en *N. oliveri.* Esta misma tendencia se observa para r_c, l y D, no comparados estadísticamente, pues dependen algebraicamente de R_0 y r_m. La tasa intrínseca de crecimiento natural así como la tasa reproductiva neta resultaron ampliamente superiores para *N. formosana*, con un R_0 de casi el doble del valor hallado para *N. oliveri* (Tabla 2) a igualdad de tiempo generacional. Esto indicaría que *N. formosana* tendría una ventaja reproductiva mayor que *N. oliveri* a nivel poblacional sobre ajo.

Los valores de r_m hallados para estas dos especies se encuentran dentro del rango esperado en áfidos

TABLA I

DURACIÓN MEDIA (± E.S.) EN DÍAS DE LOS PERÍODOS NINFAL, PRE-REPRODUCTIVO, REPRODUCTIVO, POST-REPRODUCTIVO, LONGEVIDAD Y FECUNDIDAD EN *N. OLIVERI* Y *N. FORMOSANA* SOBRE AJO (ALLIUM SATIVUM).

Especie		Ninfal	Pre-rep.	Rep.	Post-rep.	Longevidad	Fecundidad
N. oliveri	c1	7.70 (±0.73)ab	1.40 (±0.59)a	16.50 (±5.28)b	3.25 (±4.05)a	28.85 (±7.82)b	39.05 (±15.04)b
	c2	8.44 (±1.24)a	1.30 (±0.65)a	17.80 (±7.31)b	3.15 (±2.68)a	31.30 (±7.75)b	39.90 (±17.52)b
N. formosana	c1	6.80 (±1.15)c	1.15(±0.48)a	22.40 (±2.92)a	3.85 (±3.34)a	34.20 (±5.40)a	76.40 (±14.89)a
	c2	7.30 (±0.86)bc	1.45 (±0.68)a	24.60 (±3.70)a	4.00 (±3.11)a	37.35 (±5.15)a	87.65 (±23.83)a

TABLA 2
ESTADÍSTICOS VITALES DE *N. OLIVERI* Y *N. FORMOSANA* EN *ALLIUM SATIVA* L.

	Neotoxoptera oliveri		Neotoxoptera formosana	
Estadísticos vitales	Cohorte 1	cohorte 2	Cohorte 1	cohorte 2
R_o	39.05 (± 4.89) a	39.90 (± 3.46) a	76.70 (± 5.26) b	87.95 (± 4.98) b
r_m (±E. E.)	0.234 (± 0.0068) a	0.218 (± 0.0063) a	0.295 (± 0.0083) b	0.275 (± 0.0059) b
r_c	0.198	0.183	0.228	0.216
T	15.68	16.95	14.73	16.28
T_c	18.51	20.19	19.06	20.68
λ	1.219	1.200	1.256	1.242
D	2.962	3.179	2.349	2.520

R_o: tasa reproductiva neta (hembra/hembra/generación); r_m: tasa intrínseca de crecimiento natural; r_c: capacidad de incremento de la cohorte; T: tiempo generacional (días); T_c: tiempo generacional de la cohorte; λ: tasa finita de crecimiento; D: tiempo de duplicación (días). Letras iguales no difieren significativamente (α=0.05).

TABLA 3
TASAS INTRÍNSECAS DE INCREMENTO NATURAL (R_M) DE VARIAS ESPECIES DE ÁFIDOS.

Autor	Especie	Condiciones de cría	r_m
Messenger (1964)	*Therioaphis maculata*	alfalfa 21 °C	0.354
Frazer (1972)	*Aphis fabae*	arveja 20 °C	0.354
Mackauer (1973)	*Acyrthosiphon pisum*	haba 20 °C	0.366
Tremblay & Souliotis (1974)	*Myzus persicae*	pimiento 19 °C	0.335
Neubauer *et al.* (1981)	*Aphis spiraecola*	apio 25 °C	0.266
Neubauer *et al.* (1981)	*Aphis spiraecola*	citrus 25 °C	0.235
Frazer & Gill (1981)	*Macrosiphum albifrons*	lupino 20 °C	0.132
Shijko (1989)	*Schizaphis graminum*	cereales 20 °C	0.290
Kokourek *et al.* (1994)	*Aphis gossypii*	pepino 10-30 °C	0.115-0.465
Jarry (1995)	*Aphis spiraecola*	apio 25 °C	0.238
Jarry (1995)	*Aphis spiraecola*	*Spiraea* sp. 25 °C	0.253
Vasicek *et al.* (1998)	*Brevicoryne brassicae*	repollo 20 °C	0.170

si se tiene en cuenta lo expresado por otros autores. (Tabla 3). En general se advierte que este estadístico varía con las condiciones de cría, especialmente la temperatura a igualdad de especie y hospedero (Kokourek *et al.* 1994), si bien inciden otros factores como la humedad relativa y el fotoperíodo.

Las curvas de sobrevivencia (l_x) poseen tendencias similares en ambas especies comenzando a declinar en *N. oliveri* alrededor de 5-7 días antes. Es de destacar la notable diferencia existente en la altura de las curvas de fecundidad (m_x) para *N. formosana* (Fig. 2). Esto confirma el elevado potencial de reproducción de la segunda respecto de la primera especie mencionada, puesto que para una misma edad dentro del periodo reproductivo, se observa siempre una mayor descendencia en *N. formosana*.

Por todo lo expuesto se considera que infestaciones por parte de *N. formosana* en cultivos de ajo, podrían potencialmente ocasionar pérdidas en el rendimiento mayores que las que se registrarían ante *N. oliveri*. Por tal motivo sería conveniente efectuar monitoreos periódicos para detectar no sólo la presencia de áfidos sino también determinar la especie y decidir en consecuencia alguna estrategia de control.

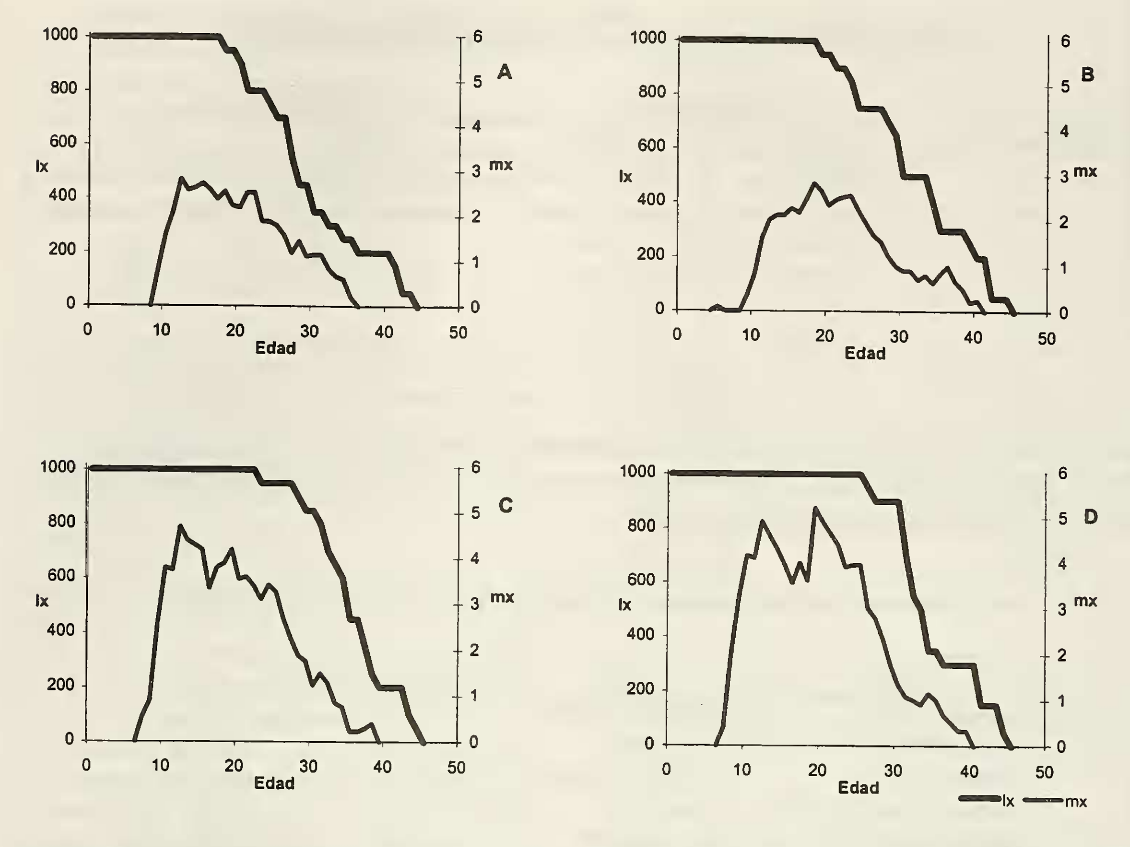


Figura 2. Curvas de sobrevivencia (l_x) y fecundidad (m_x); a y b: cohortes 1 y 2 de *N. oliveri*; c y d: cohortes 1 y 2 de *N. formosana*.

LITERATURA CITADA

Anónimo, 1998. Cultivo de ajo. Industrialización y comercialización en el Mercosur. Produciendo, *5*: 125-129.

Bengston, M., 1969. Effects of various temperatures and relative humidities on the population growth potential of *Tetranychus urticae* (Koch). Bull. Div. Pl. Ind. Qd. Dep. Prim. Industr., n°497.

Blackman, R. L. & V. F. Eastop, 1985. Aphids on the world's crops: An identification guide. John Wiley & Sons Eds., Chichester-New York-Brisbane, 466 pp.

Frazer, B. D. 1972, Life tables and intrinsic rates of increase of apterous black bean aphids and pea aphids, on broad bean. Can. Ent., *104*: 1717-1722.

Frazer, B. D. & B. Gill, 1981. Age, fecundity, weight, and intrinsic rate of increase of the Lupine Aphid *Macrosiphon albifrons* Essig (Homoptera:Aphididae). Can. Ent., *113*: 739-745.

Hulting, F. L., D. B. Orr & J. J. Obrycki, 1990. A computer program for calculation and statistical comparison of intrinsic rates of increase and life tables parameters. Florida Entomologist, *73*: 601-612.

Jarry, I., 1995. *Aphis spiraecola* Patch: a comparative r_m calculation of a dwarf strain obtained from laboratory rearing on celery (*Apium graveolens* L.) vs. the strain living on spirea (*Spiraea* spp.). Boll. Lab. Ent. Agr. Filippo Silvestri, *50*: 157-173.

Kocourek F., J. Havelka, J. Berankova & V. Jarosik, 1994. Effect of temperature on development rate and intrinsic rate of increase of *Aphis gossypii* reared on greenhouse cucumbers. Entomol. Exp. Appl., *71*: 59-64.

Lange Jr., W. H., 1944. The effect of the war on truck crop insect control in California. Journal of Economic Entomology, *37*: 734-737.

Mackauer, M., 1973. The population growth of the pea aphid biotype R1 on broad bean and pea. (Homoptera:Aphididae). Z. Angew. Ent., *74*: 343-351.

Messenger, P. S., 1964. Use of life tables in a bioclimatic study of an experimental Aphid-Braconid Wasp host-parasite system. Ecology, *45*: 119-131.

Neubauer, I., B. Raccah; I. Ishaaya; N. Aharonson & E. Swirski, 1981. The effect of hosts exchange on the population dynamics of the spirea aphid *Aphis citricola* Van del Goot (Hom., Aphididae). Z. Ang. Ent., *91*: 231-236.

Nieto Nafría, J. M.; M. A. Delfino & M. P. Mier Durante, 1994. La afidofauna de la Argentina, su conocimiento en 1992. Secretariado de publicaciones Universidad de León, León, España, 235 pp.

Rabinovich, J. E., 1980. Introducción a la ecología de poblaciones animales. Compañía Editorial Continental, S. A. Mexico D.F., 313 pp.

SHUKO, E. S., 1989. Rearing and application of the peach aphid parasite, Aphidius matricariae (Hymenoptera: Aphididae). Acta Ent. Fennica, *53*: 53-56.

SOUTHWOOD, T. R. E., 1994. Ecological methods. 2nd Ed. Chapman & Hall, London, 524 pp.

SOUZA-SILVA, C. R. & A. ILHARCO, 1995. Afídeos do Brasil e suas plantas hospedeiras (lista preliminar). EDUFSCar, 85 pp.

STARÝ, P., F. RODRÍGUEZ & G. REMAUDIÉRE, 1994. Asociación planta-áfidos-parasitoide (Hom., Aphidoidea; Hym., Aphididae), en la zona central de Chile. Agricultura Técnica, *54*: 46-53.

TREMBLAY, E & C. SOULIOTIS, 1974. Saggio su un indice bioclimatico per il *Myzus persicae* Sulz. (Homoptera: Aphidoidea). Boll. Lab. Ent. Agr. Filippo Silvestri, *31*: 109-120.

TUKEY, J. W., 1958. Bias and confidence in not quite large samples. Annals of Mathematical Statistics, *29*: 614.

VASICEK, A., F.R. LA ROSSA; S. RAMOS & A. NORIEGA, 1998. Efecto de la temperatura sobre el «pulgón del repollo» (*Brevicoryne brassicae* L.) (Homoptera: Aphidoidea). Rev. Facultad de Agronomía (UBA), 18: 99-103.